



TITLE:

ゲルろ過による脂溶性ビタミンの
分離定量に関する研究(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

牧野, 輝勇

CITATION:

牧野, 輝勇. ゲルろ過による脂溶性ビタミンの分離定量に関する研究. 京都大学, 1971, 薬学博士

ISSUE DATE:

1971-01-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/213565>

RIGHT:

氏 名	牧 野 輝 勇 まきのてるお
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 87 号
学位授与の日付	昭 和 46 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	ゲルろ過による脂溶性ビタミンの分離定量に関する研究

論文調査委員 (主 査)
教 授 山 科 郁 男 教 授 宇 野 豊 三 教 授 富 田 謙 吉

論 文 内 容 の 要 旨

脂溶性ビタミンそれぞれの定量法については多くの研究があり、日本薬局方はじめ各国の公定書にもそれぞれの定量法が規定されほとんど完成されたといつてもよい現状である。しかし、最近脂溶性ビタミンが各種の医薬製剤に配合され、また食品にも添加されるようになってきたため、他のビタミンやビタミン以外の成分が共存する場合の分離定量法の確立が望まれるようになった。しかし、今まで報告されている各種の分離定量法は操作が繁雑であり、また再現性に乏しく、実用に供されている定量法は実際に存在していないといっても過言ではない。著者はゲルろ過による脂溶性ビタミンの分離定量法の確立を試み、以下の研究によりその有用性を明らかにすることができた。一般に、多成分の混合物について分離定量を行う場合、クロマトグラフィーが最も有効な手段と考えられ、事実脂溶性ビタミンについても各種のクロマトグラフィーが試みられている。しかし、通常分離定量の対象となるビタミンA、ビタミンD、ビタミンE及びビタミンKなどの脂溶性ビタミンは一般に酸化その他の分解を受けやすいため、例えば、吸着クロマトグラフィーでは吸着による分解を避けることができない。また比較的條件の緩和な分配クロマトグラフィーは固定相、移動相の調製にやや難点がある。ゲルろ過は蛋白質、多糖、核酸などの分離、精製、濃縮、脱塩などに広く利用されているが、架橋デキストラン、ポリアクリルアミド、寒天、架橋ガラクトマンナン、ポリスチレン、硬化ゴムなどを水または適当な溶媒中で膨潤ゲル化させ、このゲルの内部に保持される溶媒と外部を移動する溶媒との間の分配にもとづき、物質の分離を行なうもので吸着等による試料の分解もなく、また操作も極めて簡単である。従って脂溶性ビタミンに属する各ビタミンの分子サイズ—分子量—の差を識別できる程度の網目構造をもつゲルを使用すれば脂溶性ビタミン相互間の分離が可能となり、すぐれた分離定量法が得られるものと期待される。

著者はまずビタミンAアルコール、ビタミンAパルミテート、ビタミンD₂、ビタミンEについてゲルろ過における挙動を調べ、Sephadex LH20 のゲルを使用しクロロホルムを溶出溶媒とした場合、相互間の分離に利用できることを見出した。

つぎに分離の条件を明らかにするため、ビタミン A, D, E, K ならびに文献上未知の化合物10種を含む関連化合物30種について、Sephadex LH20 のカラムを用いクロロホルムで溶出を行なった場合の分配係数 K_D を測定した。分離定量の対象と考えられるビタミンAアルコール、ビタミンD₂、ビタミンD₃、ビタミンEはそれぞれ K_D 値 0.97, 0.57, 0.60, 0.49 を示し、 K_D 値の差が比較的大きく、本法がこれら脂溶性ビタミンの分離定量に有用であることが分った。また分配係数と分子量との関係について考察を加え、これらの化合物はビタミンAアルコール、ビタミンD、ビタミンEのように遊離の水酸基を有する化合物のグループ（グループⅠ、ビタミンA, D, Eなどのエステル類、 β -カロチン、ビタミンKのように遊離の水酸基またはカルボキシル基を有しない化合物のグループ（グループⅡ）、ビタミンA酸、ビタミンEサクシネートのように遊離のカルボキシル基を有する化合物のグループ（グループⅢ）の3つに分けられることを見出した。分子量と K_D の対数との間にはグループⅠでは

$$\log (K_D \times 100) = 2.4028 - 0.0016M \quad (M: \text{分子量})$$

$$\text{グループⅡでは } \log (K_D \times 100) = 1.8906 - 0.0013M \quad (M: \text{分子量})$$

の直線関係が成立することが分った。また、遊離のカルボキシル基を有するグループⅢの化合物はカラムに強く吸着され、ほとんどカラム上の移動は認められず、 $K_D > 1$ を示した。これより水酸基、カルボキシル基の存在は溶出の遅延に影響を及ぼすことが明らかになった。

また K_D の差が大きくても実際にゲルろ過において脂溶性ビタミンを分離する条件を知るため、ゲルろ過時の溶出容量 V_e 、溶出曲線のすそのひろがり W についてガスクロマトグラフィーにおける分離度の式を適用し検討を加えた。この場合

$$R = 2 (V_{e2} - V_{e1}) / (W_1 + W_2)$$

$$(V_{e1}, V_{e2}, W_1, W_2 \text{ は 2 成分の } V_e, W \text{ を示し } V_{e2} > V_{e1})$$

の式が成立し、 $V_{e2} - V_{e1} > 60 \sim 80$ ($W = 40$) すなわち $R > 1.5 \sim 2.0$ ならば分離が完全と考えられる。これについて各種の大きさおよび形状の異つたカラムを使用して検討を加えたところ、 $R > 2$ 以上の条件を満足すれば分離定量の目的に供しうることが明らかになった。また溶出速度が分離度に影響を及ぼすことを認め、カラムの効率を示す理論段数について検討を加えて溶出速度と分離の効率との関係を見出した。さらに分離に及ぼす試料溶液の添加量について検討し、試料溶液の添加量が $(K_{D1} - K_{D2}) V_i$ (V_i : ゲル内部の溶媒保持量) の $\frac{1}{2}$ 以下の場合には分離の目的を満足することを見出した。

以上のように、Sephadex LH 20のカラムを使用しクロロホルムを溶出溶媒とするゲルろ過が脂溶性ビタミンの分離に適していることを明らかにすることができたので、これを利用して脂溶性ビタミンの分離定量を試みた。その結果、けん化・抽出・ゲルろ過の操作から成るビタミンA・Eの分離定量法を確立することができ、また同時にビタミンEの分解を起こさないアルカリけん化の条件を明らかにすることができた。またビタミンA・Dの分離の際にビタミンDに対するビタミンAの配合量が著しく多い場合に問題となるビタミンA中の不純物について検討を加え、適当な条件下での Florex (フラー土) 吸着クロマトグラフィーによつてこれを除去することができることを見出した。これに基づいてけん化、抽出、ゲルろ過、Florex xxs の吸着クロマトグラフィーの操作から成るビタミンA・Dの分離定量法を確立した。これらのビタミンA・E、ビタミンA・Dの分離定量法を各種の製剤に応用して十分な成果をおさめ、さら

に肝油の精製、アンヒドロビタミン、ビタミンA酸化生成物のビタミンAアルコールとの分離、強化食品中ビタミンAの定量にも利用することができた。

以上のように著者は脂溶性ビタミンの分離に Sephadex LH20 を使用するゲルろ過が有用なことを見出し、分離に影響を及ぼす条件の検討を行なって分離条件を明確にすると共に、ビタミンA・E、ビタミンA・Dの分離定量法、食品中のビタミンAの定量法を確立することができた。

論文審査の結果の要旨

脂溶性ビタミンの個別の定量法は現在ほとんど完成されているが、その数種が共存する場合の系統的分別定量法に関しては極めて不満足な状態にある。最近、医薬品製剤、食品、飼料に各種の脂溶性ビタミンが添加されることが多く、そのため、それらの分別定量法の確立が強く望まれている。

本論文は、ゲルろ過による脂溶性ビタミンの分別定量法の基礎および応用に関するものである。

ゲルろ過は生化学領域において汎用されているが、簡単な操作、および温和な条件によって、分子量の異なる物質を分別するものである。本論文においては、ゲルろ過が比較的不安定な脂溶性ビタミンの分別に極めて有用であることが示されている。

先ず、分別における諸条件が詳細に検討され、次いで、各種天然ビタミンおよびその誘導体について、その分子量および分子構造と分配係数との間の関係についての広汎な測定がなされている。その結果、水酸基を有するビタミンAアルコール、ビタミンD₂等と、水酸基を有しない、脂溶性ビタミンエステルそれぞれの群について分子量と分配係数の関係を示す実験式が導かれている。また、従来、分離困難のため定量誤差の原因となっていたビタミンAに混在する不純物の影響も除かれている。

以上の基礎的研究を基にして各種のビタミン製剤、ビタミン強化食品についての分析がなされ、極めて満足すべき結果が得られている。

以上、本論文は、ゲルろ過の原理を巧みに利用して脂溶性ビタミンの系統的分別定量の方法を確立し、さらに、医薬品、食品の分析への応用にも成功しており、薬品分析学上寄与するところが大きい。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。